

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

APPLICANT: JAE-HOON LEE, ET AL.)
)
FOR: METHOD FOR DETECTING PCR PRODUCT)
USING ELECTRICAL SIGNAL)

CLAIM FOR PRIORITY

Mail Stop Patent Application
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Commissioner:

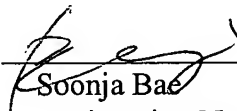
Enclosed herewith is a certified copy of Korean Patent Application No. 2002-0070141 filed on November 12, 2002. The enclosed Application is directed to the invention disclosed and claimed in the above-identified application.

Applicant hereby claims the benefit of the filing date of November 12, 2002, of the Korean Patent Application No. 2002-0070141, under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By:



Soonja Bae

Registration No. (Please see attached)
Cantor Colburn LLP
55 Griffin Road South
Bloomfield, CT 06002
Telephone: (860) 286-2929
PTO Customer No. 23413

Date: September 9, 2003

**KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE**

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

Application Number: Patent Application No. 2002-70141

Date of Application: 12 November 2002

Applicant(s): Samsung Electronics Co., Ltd.

11 August 2003

COMMISSIONER

1020020070141

2003/8/13

[Document Name] Patent Application
[Application Type] Patent
[Receiver] Commissioner
[Reference No.] 0017
[Filing Date] 2002.11.12
[IPC] C12Q
[Title] A method for detecting a PCR product by measuring a electrical signal

[Applicant]

[Name] Samsung Electronics Co., Ltd.
[Applicant code] 1-1998-104271-3

[Attorney]

[Name] Young-pil Lee
[Attorney's code] 9-1998-000334-6
[General Power of Attorney Registration No.] 1999-009556-9

[Attorney]

[Name] Hae-young Lee
[Attorney's code] 9-1999-000227-4
[General Power of Attorney Registration No.] 2000-002816-9

[Inventor]

[Name] LEE, Jae Hoon
[I.D. No.] 670326-1009220
[Zip Code] 449-901
[Address] c/o Samsung Advanced Institute of Technology, San14-1 Nongseo-ri,
Kiheung-eub, Yongin-city, Kyungki-do
[Nationality] Republic of Korea

[Inventor]

[Name] LEE, Jae Chang
[I.D. No.] 721218-1455112

1020020070141

2003/8/13

[Zip Code] 445-975
[Address] 3-608 Sinhyundai Apt., 97-129 Songsan-ri, Taeaeon-eub, Hwaseong-gun, Kyungki-do
[Nationality] Republic of Korea

[Inventor]

[Name] YOON, Dae Sung
[I.D. No.] 681111-1067427
[Zip Code] 463-010
[Address] 101, 247-2 Jeongja-dong, Bundang-gu, Seongnam-city, Kyungki-do
[Nationality] Republic of Korea

[Inventor]

[Name] LIM, Geun Bae
[I.D. No.] 650323-1682919
[Zip Code] 442-745
[Address] 232-1205 Hwanggol Maeul Poonglim Apt., Youngtong-dong, Paldal-gu, Suwon-city, Kyungki-do
[Nationality] Republic of Korea

[Application Order]

I/We file as above according to Art. 42 of the Patent Law.
Attorney Young-pil Lee
Attorney Hae-young Lee

[Fee]

[Basic page]	20 Sheet(s)	29,000 won
[Additional page]	5 Sheet(s)	5,000 won
[Priority claiming fee]	0 Case(s)	0 won
[Examination fee]	0 Claim(s)	0 won
[Total]	34,000 Won	

[Enclosures]

1. Abstract and Specification (and Drawings)_1 copy



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0070141
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 11월 12일
Date of Application NOV 12, 2002

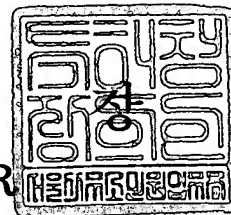
출원인 : 삼성전자주식회사
Applicant(s) SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.



2003 년 08 월 11 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0017
【제출일자】	2002.11.12
【국제특허분류】	C12Q
【발명의 명칭】	전기적 신호를 측정하는 P C R 증폭 산물을 검출하는 방법
【발명의 영문명칭】	A method for detecting a PCR product by measuring a electrical signal
【출원인】	
【명칭】	삼성전자 주식회사
【출원인코드】	1-1998-104271-3
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	1999-009556-9
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【포괄위임등록번호】	2000-002816-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이재훈
【성명의 영문표기】	LEE, Jae Hoon
【주민등록번호】	670326-1009220
【우편번호】	449-901
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 농서리 산14-1 삼성종합기술원
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이재창
【성명의 영문표기】	LEE, Jae Chang
【주민등록번호】	721218-1455112
【우편번호】	445-975

【주소】	경기도 화성군 태안읍 송산리 97-129 신현대아파트 3동 608호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	윤대성		
【성명의 영문표기】	Y00N,Dae Sung		
【주민등록번호】	681111-1067427		
【우편번호】	463-010		
【주소】	경기도 성남시 분당구 정자동 247-2 101호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	임근배		
【성명의 영문표기】	LIM,Geun Bae		
【주민등록번호】	650323-1682919		
【우편번호】	442-745		
【주소】	경기도 수원시 팔달구 영통동 황골마을풍림아파트 232동 1205호		
【국적】	KR		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 필 (인) 대리인 이해영 (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	5	면	5,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】	34,000 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 (a) PCR 반응 용기 내에 한 쌍 이상의 전극을 제공하는 단계; (b) PCR을 수행하는 단계; (c) 상기 전극 사이에 전기장을 발생시키는 단계; 및 (d) 상기 PCR 반응 용액의 유전적 특성의 변화를 측정하는 단계를 포함하는 PCR 증폭 산물을 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, PCR 산물을 리얼타임으로 검출할 수 있다

【대표도】

도 1

【색인어】

전기적 신호, 임피던스, 리얼타임 PCR

【명세서】**【발명의 명칭】**

전기적 신호를 측정하는 P C R 증폭 산물을 검출하는 방법{A method for detecting a PCR product by measuring a electrical signal}

【도면의 간단한 설명】

도1은 전극이 설치된 PCR 튜브를 나타내는 도면이다.

도2는 전극이 설치된 PCR 챔버를 함유하는 PCR 칩의 일실시예를 나타내는 도면이다.

도3 내지 5는 각각 상기 PCR 칩의 평면도, 평면 단면도 및 측면 단면도이다.

도6 및 7은 각각 상기 PCR 칩의 중합 반응 챔버 및 전극을 구현하는 과정을 나타내는 도면이다.

도8은 대조군 PCR 사이클에서 주파수에 대한 임피던스 실수부를 나타내는 도면이고,

도9는 대조군 PCR 사이클에서 주파수에 대한 임피던스 크기값을 나타내는 도면이다

도10은 실제 PCR 사이클에서 주파수에 대한 임피던스 실수부를 나타내는 도면이다.

도11은 실제 PCR 사이클에서 주파수에 대한 임피던스 크기값을 나타내는 도면이다.

도12는 대조군 PCR 사이클에 대한 임피던스 크기값을 나타내는 도면이다.

도13은 실제 PCR 사이클에 대한 임피던스 크기값을 나타내는 도면이다.

도14는 오차를 수정한 실제 PCR 사이클에 대한 임피던스 크기값을 나타내는 도면이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <12> 본 발명은 전기적 신호를 이용한 PCR 증폭 산물을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- <13> 바이오센서(biosensor)라면 효소센서와 면역계의 반응을 이용한 면역센서가 대표되어져 왔다. 그러나, 인간 게놈프로젝트에서 얻어진 방대한 DNA의 정보로부터 인간의 유전적 병을 조기에 발견하고 치료할 수 있는 가능성과 그에 따른 기대가 커지고 있으며, 이로서 바이오센서의 분야에 또 다른 센서로서 DNA칩이 자리 매김을 하고 있다. 현재 바이오센서 개발의 추세는 저렴성, 신속성, 정확성, 조작의 간편성 그리고 소형화(휴대성)에 주력하고 있으며, DNA로부터 인간의 질병을 조기발견하기 위한 DNA 센서도 이에 초점을 맞추어 개발되어야 세계시장에서의 경쟁력을 갖출 수 있다.
- <14> 유전분석에서 빼놓을 수 없는 방법이 80년대 말에 발명되어 모든 임상, 생물, 유전 실험실에서 흔히 볼 수 있는 PCR을 이용한 DNA의 분석방법이다.
- <15> 기존의 PCR은 단지 종말점(End-Point)에서 젤영동을 이용하여 증폭된 DNA의 정성적인 결과만을 보여주는 것으로서 DNA의 정량적 검출에서 정확성 등 많은 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해서, 광학적 검출시스템을 이용하여 증폭된 DNA의 농도에 비례하는 형광의 세기를 검출함으로써 DNA의 정량분석을 가능케 해주는 리얼타임 PCR 장치가 개발되었다.

- <16> DNA의 정량분석은 질병의 치료와 DNA 발현의 연구에 필수이다. 예로 B 형 간염 바이러스(HBV)에 감염된 간염 환자의 성공적인 약물치료를 위해서 정기적으로 혈장의 HBV의 농도를 리얼타임 RT-PCR을 이용하여 정량 측정함으로써, 투여되는 약물에 대한 바이러스의 내성을 검사해야만 한다.
- <17> 종래의 리얼타임 PCR은 레이저 소스와 미세거울, 현미경 이외에 필터 등의 여러 광학장치가 필요함과 동시에 고가의 형광 염료가 사용되어지고 있었다. 또한, DNA 정량 분석을 위한 많은 PCR칩이 개발되었으나, 종래의 리얼타임 PCR 칩은 형광 검출의 원리에 의한 방법이기에 소형화(칩화)와 경제성에서 많은 단점을 가지고 있었다.
- <18> 이 문제를 극복하고자 모세관 전기 영동(CE: capillary electrophoresis)을 이용하여 전기적으로 DNA를 검출하고자하는 노력이 있었다(Colyer 등, 1997; Dolnuk 등, 2000; Hashimoto 등, 2000; Ueda 등, 2000), 이 방법은 정성분석이 가능하고 정량분석을 하기에 많은 문제가 있을 뿐더러 PCR이 끝난 뒤 산물을 미세채널을 이용하여 모세관 전기영동 검출시스템까지 옮겨야 하는 번거로움과 높은 전압이 필요하다는 점에서 경제성과 또 그에 따른 기기의 소형화에 문제가 있다.
- <19> 밀스(Miles) 등은 PCR 과정 중에서 DNA의 농도가 증가함에 따라 저항값이 작아지고, 전도성은 증가한다는 개념에 근거하여 특허 출원하였다(미국특허출원 2002/0072054A1). 그러나, 밀스 등이 밝힌 PCR 과정 중에서 DNA의 농도가 증가함에 따라 저항값이 작아진다는 주장은, 본 발명자들이 확인한 결과와는 상이한 점이 있다. 따라서, 이들의 특허는 PCR 반응의 메커니즘을 이해하지 못한 면이 있다.
- <20> PCR 과정에서 dNTP는 dNMP와 디포스페이트로 분해됨과 동시에, dNMP는 주형 DNA 서열에 상보적인 프라이머에 중합되어 DNA가 합성된다. 이때 부산물인 디포스페이트의 전

기적 이동성(mobility)만을 고려한다면, 상기 출원의 개시 내용은 옳겠으나, DNA의 합성 시 전하를 가지고 있는 dNMP, 프라이머 및 주형에 의하여 감소되어지는 전기적 운동성까지 고려하면 DNA의 농도의 증가에 따라 PCR에서 저항은 증가한다. 또한, 상기 출원은 리얼타임 PCR 칩이 아닌 종말점 검출 PCR 칩이라는 점에서, 리얼타임 PCR 칩과는 다르다. 또한, 상기 출원은 증폭된 PCR 산물을 검출하기 위하여 이온적으로 표지된 프로브를 사용해야 한다는 문제점이 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, PCR 용액 중의 전기적 신호의 변화를 측정하여 PCR 증폭 산물을 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <22> 본 발명은 (a) PCR 반응 용기 내에 한 쌍 이상의 전극을 제공하는 단계;
- <23> (b) PCR을 수행하는 단계;
- <24> (c) 상기 전극 사이에 전기장을 발생시키는 단계; 및
- <25> (d) 상기 PCR 반응 용액의 유전적 특성의 변화를 측정하는 단계를 포함하는 PCR 증폭 산물을 검출하는 방법을 제공한다.
- <26> 본 발명에서 (a)단계에 있어서, 상기 PCR 반응 용기는 통상의 벌크 PCR 튜브 또는 미세 중합 반응 챔버가 포함되나, 여기에 한정되는 것은 아니다. 상기 전극은 PCR 반응 용기에 서로 대향하도록 배치된다. 벌크 PCR 튜브의 경우, 튜브의 일정한 높이에 서로 대향하도록 설치할 수 있다. 미세 중합 반응 챔버의 경우, 챔버의 상하 또는 좌우측면에

서로 대향하도록 설치할 수 있다. 이때 상기 전극 설치를 위하여 통상적인 여러 방법, 예를 들면 포토리소그래피법을 사용할 수 있다. 또한, 상기 전극은 여러 가지 금속 전극, 예를 들면 구리 전극, 크롬-금 전극 또는 실리콘 상에 비소(As)를 도핑하여 만든 전극을 사용할 수 있다.

<27> 본 발명의 (b)단계에 있어서, PCR을 수행함에 있어 PCR 반응에 필요한 반응물이나 용액 이외에 전기적 신호를 발생시키기 위하여 특별히 표지된 프로브나 프라이머를 사용할 필요가 없다. 따라서, 본 발명에서는 이온적으로 표지된 프라이머(ionically labeled primer)를 사용할 필요가 없다. 다만, 본 발명은 전기적 신호를 발생시키기 위하여 특별히 표지된 프로브나 프라이머를 사용하지 않더라도 PCR 산물을 검출할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<28> 본 발명의 (c)단계에 있어서, 상기 전기장은 상기 한 쌍의 전극에 연결된 통상적인 교류 또는 직류 공급기를 통하여 발생된다. 상기 전기장을 발생시키는데 사용된 교류의 주파수는 바람직하기로는 1Hz 내지 100 MHz이다. 평균 전압(V_{rms})은 바람직하기로는 1 mV 내지 10 V이다.

<29> 본 발명의 (d)단계에 있어서, 상기 유전적 특성은 전기장을 통하여 파생되는 임피던스, 유전 손실, 유전 상수 또는 어드미턴스가 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 전기적 계수는 상기 전극에 연결된 상기 유전적 특성의 측정수단을 통하여 측정할 수 있다. 예를 들면, 상기 전극에 작동가능하게 연결된 임피던스 센서를 사용할 수 있다.

<30> 이하 본 발명을 도면을 참조한 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<31> 실시예

<32> 실시예1: 전극이 설치된 PCR 튜브의 제작

<33> 통상적인 PCR 튜브에 PCR 용액의 중간 부분에 전극을 삽입할 수 있도록 구멍을 만들고, 전극을 삽입하였다. 다음으로, 이 전극을 PCR 기기와 연결한 후 PCR을 수행하면서, 각 사이클 직후 전기적 신호를 검출하였다. 본 발명에서는 증폭되는 DNA를 임피던스를 이용하여 측정하였다.

<34> 구체적으로는, 0.2ml PCR 튜브의 바닥으로부터 5mm 지점에 튜브의 양쪽 벽면에 직경 0.3 mm의 구멍을 내고, 0.32 mm의 지름을 가진 전선을 삽입하여 전극으로 사용하였다. 이 전극은 은(silver)이 코팅되어 있고, 테플론 피복이 입혀있는 구리전선이다. 전극은 튜브의 벽에 고온 에폭시를 이용하여 전극간의 거리 1.5 mm가 유지되도록 고정하였다. PCR 용액이 존재하는 튜브의 하단 부분 지름을 약 1.5mm로 하여 그 튜브 내 벽면에 작은 전극을 설치하였으므로, 전극의 표면적을 줄일 수 있었다(도1). 전극의 표면적을 줄임으로써 전극 표면에서 일어나는 효소 또는 PCR 성분의 흡착을 줄일 수 있고, 그로 인한 검출의 감도 및 산물 수율을 향상시킬 수 있었다.

<35> 실시예 2: 챔버의 상부와 하부에 전극이 구현된 3 단 구조의 PCR 칩의 제작

<36> 도6 내지 7에 나타낸 바와 같은 과정을 거쳐, 챔버의 상부와 하부에 전극이 구현된 PCR 칩을 제작하였다.

<37> 먼저, 비소(As)가 도핑된 N-형 실리콘 웨이퍼(1)를 열산화시켜, 약 5,000Å 이상의 SiO₂ 층(3)을 형성하였다(A 단계). 그 다음, 상기 산화막층을 포토레지스트 AZ 5214(5)로 도포하였다(B 단계). 상기 포토레지스트에 포토리소그래피법을 이용하여 상부와 하부

전극을 패터닝한 다음, 상기 패터닝된 부분의 SiO_2 층을 제거하기 위하여 산화막 식각액(HF)에 웨이퍼를 넣어 SiO_2 를 식각하였다. SiO_2 가 식각된 웨이퍼에 전자빔(e-beam) 또는 스퍼터링을 이용하여 크롬(Cr) 및 금(Au) 박막(7)을 상부면에 증착시키고, 하부면에는 알루미늄(Al) 박막(9)을 증착시켰다(C 단계). 그 다음, 리프트 오프 방식을 이용하여 상부 전극에 금전극을 구현하였다(D 단계). 상기 금전극의 반대면에 포토레지스트를 도포하고(E 단계), 알루미늄 박막(9)상에 포토레지스트 패턴을 형성하고, 알루미늄 박막층(9)을 식각한 다음, 다시 SiO_2 층(3) 및 실리콘(1)을 ICP-RIE를 이용하여 건식 식각하였다(F, G, H 및 I 단계). 식각 후 잔여 포토레지스트를 아세톤을 이용하여 녹여내고, 잔여 알루미늄 박막을 식각하였다(J, K 단계).

<38> 얻어진 상부 및 하부 전극이 구현된 실리콘 웨이퍼(1)와 샌드 블라스트 공법에 의하여 PCR 칩의 반응 챔버용 구멍이 설치된 유리 웨이퍼(11)를 양극 접합법(anodic bonding)을 이용하여 접합하였고, 접합된 웨이퍼를 다이싱하여 최종 칩을 생산하였다. 상기 양극 접합법은 실리콘 웨이퍼와 유리 웨이퍼를 접합시키기 위한 방법으로서, 높은 전기장과 열을 가하여 유리 웨이퍼 내에 존재하는 양전하를 띤 이온(예를 들면, Na^+ 이온)들을 실리콘과 유리가 접지하는 반대편으로 이동시켜 실리콘 웨이퍼와 유리 웨이퍼의 표면에서 수소결합을 형성시켜 두 웨이퍼를 접합시키는 것이다.

<39> 본 실시예의 제작 공정은 종래 평면적으로 일정한 영역에 구현되었던 전극을 삼차원적으로 서로 마주보는 전극(상부, 하부)을 구현하여 제작한 것으로서, PCR 반응 중 증폭되는 DNA를 챔버에서 전체적으로 검출할 수 있도록 하였다.

<40> 본 실시예에 의하여 제작된 PCR 칩을 도2 내지 5에 나타내었다. 도2는 상기 PCR 칩의 사시도이다. 도3은 상기 PCR 칩의 평면도로서 입구(13)와 출구(15)가 도시되어 있다.

도4는 상기 PCR 칩의 평면 단면도로서 중합 반응 챔버(17)와 하부 전극(19)이 도시되어 있다. 도5는 상기 PCR 칩의 측면 단면도로서, 입구(13), 출구(15), 상부 전극(21), 하부 전극(19), 중합 반응 챔버(17) 및 유리 웨이퍼(11)가 도시되어 있다.

<41> 실시예3 : 실리콘 직접 결합을 통한 2단 구조의 PCR 칩의 제작

<42> 상기 실시예2에 있어서, 상부와 하부 전극이 구현된 실리콘 웨이퍼를 직접 결합시키는 실리콘 직접 접합(silicon direct bonding)법을 사용하여 실리콘 웨이퍼와 실리콘 웨이퍼를 접합한, 2단구조의 PCR 칩을 제작한 것을 제외하고는 실시예2와 동일한 과정을 거쳤다.

<43> 본 실시예에서는 유리 웨이퍼를 사용하지 않았으므로, 생산단가와 챔버의 부피를 용이하게 조절할 수 있었다. 이 방법을 이용하는 경우, 금속 전극을 이용하지 않고, 비소(As) 도핑된 N-형의 실리콘 웨이퍼상의 SiO₂ 층을 작은 면적으로 식각하여 바로 전극으로 사용함으로써, 금속표면에 생물물질이 흡착하는 것을 막을 수 있어 PCR 산물 수율과 검출 감도를 향상시킬 수 있다.

<44> 실시예4: PCR 반응 산물의 실시간 검출

<45> 본 실시예에서는 실시예1에서 제작된 전극이 구현된 PCR 튜브 및 상기 전극에 작동적으로 연결된 임피던스 측정 장치를 포함하는 PCR 기기를 이용하여 PCR 산물을 실시간으로 검출하였다.

<46> PCR 반응은 플라스미드 DNA(323bp)를 주형으로 하고, *Tag* DNA Polymerase를 이용하여 PCR을 수행하였다. 총 35사이클의 PCR에서 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 및 35 사이클에서, 1분 동안의 연장 반응이 끝난 뒤에 임피던스(저항) 값을 측정하였다. 이때 측정은

도는 연장 온도와 같았고, 전압은 100mV의 교류전압을 인가하여 500~5,000 Hz 주기 범위에서 측정하였다. 대조군으로서, DNA 주형없이 동일하게 PCR을 수행한 다음, 임피던스를 측정하였다.

<47> 그 결과를 도8 내지 11에 나타내었다. 도8은 대조군 PCR의 사이클의 증가에 따른 주파수에 대한 임피던스 실수부(impedance real)의 변화를 나타내는 그래프이다. 도8에 나타낸 바와 같이, PCR 사이클의 증가에 따라 임피던스 실수부는 증가한다. 또한, 주파수가 작은 영역에서 큰 영역으로 갈수록 1 사이클과 35 사이클의 임피던스 실수부의 차이가 작아짐을 알 수 있었다.

<48> 도9는 대조군 PCR의 사이클의 증가에 따른 주파수에 대한 임피던스 크기 값(impedance magnitude)의 변화를 나타내는 도면이다. 도9에 나타낸 바와 같이, 임피던스 허부수(impedance imaginary)의 PCR 사이클의 증가에 대한 변화는 도1에 나타낸 임피던스 실수부 및 허부수의 변화, 탄젠트 델타 등의 값들과 비교했을 때 현저하게 작음을 알 수 있었다. 약 1,000 Hz대에서는 PCR 사이클의 증가에 대한 임피던스 크기 값의 변화는, 거의 없음을 알 수 있었다. 주파수가 1077 Hz일 때의 1 사이클과 35 사이클에서의 임피던스 값의 차가 약 45 Ω 이었다. DNA의 증폭이 없음에도 임피던스 값의 변화가 발생하는 것은 dNTP, 프라이머 및 효소 등이 전극에 흡착되는 현상과 이 검출 시스템이 포함하고 있는 측정시의 간섭(interference) 때문이다. 이 오차값은 DNA의 증폭이 있는 PCR에서의 검출 결과 값에서 고려되어야 한다.

<49> 도10은 PCR 사이클의 증가에 따라 주파수에 대한 임피던스 실수부의 변화를 나타내는 그래프이다. 도8에 나타낸 바와 같이, PCR 사이클에 따라 DNA 농도가 증가하면, 임피

던스 실수부는 현저한 차이를 보이게 된다. 도10은 PCR 사이클의 수가 n 으로 되었을 때, DNA는 2^n 배로 증가한다는 이론과 부합하는 것이다.

<50> 도11는 PCR 사이클의 증가에 따라 주파수에 대한 임피던스 크기값의 변화를 나타내는 그래프이다. 도11에 나타낸 바와 같이, PCR 사이클의 증가에 따라 임피던스 크기값이 뚜렷하게 증가함을 알 수 있었다. 1 내지 5 사이클에서 저항값의 변화가 적은 DNA의 증폭이 지수적으로 일어난다는 이론에 의하여 설명되어지고, 30 내지 35 사이클에서 저항값의 차이가 적은 것은 PCR 성분의 고갈되면서, 정상기(plateau phase)가 된다는 것으로 설명이 되어진다.

<51> 이상과 같이 도8 내지 11에 나타낸 결과로부터, PCR 사이클의 증가에 따른 DNA 산물의 농도를 정량적으로 분석하기 위하여는 임피던스 실수부, 허수부, 탄젠트 델타와 같은 측정값 보다는 임피던스 크기값이 가장 적합한 것으로 판명되었다. 그 이유는 도8 및 9의 결과에 나타낸 바와 같이, 시스템의 간섭의 크기가 다른 측정값과 비교하여 볼 때, 임피던스 크기값이 제일 작은 값을 보이기 때문이다.

<52> 실시예 5: 특정한 주파수에서의 PCR 사이클에 대한 임피던스 크기 값의 변화

<53> 일정한 주파수에서 PCR 사이클에 대한 임피던스 크기 값의 변화를 측정하는 것을 제외하고는, 실시예4와 동일한 방법으로 실험하였다. 실시예4에서 약 1,000 Hz의 주파수에서 PCR 이론에 가장 부합되는 결과를 보여주었으므로, 이 근처의 주파수인 1,077 Hz에서의 PCR 사이클의 증가에 따라 DNA 증폭시와 증폭이 일어나지 않을 때의 전기적 저항을 측정하였다. 그 결과를 도12 및 13에 나타내었다.

<54> 도12는 대조군 PCR 반응 용액에 대하여 실시간으로 임피던스 크기 값을 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, 도13은 실제 PCR이 진행됨에 따라 증폭된 DNA를 실시간으로 검출한 결과를 나타내는 그래프이다. 도12에서는 실시예4에서 살펴본 바와 같이, 임피던스 크기 값의 차이가 45Ω이었다. 이는 검출 시스템의 간섭에 의하여 발생하는 오차값이다. 도13에 나타낸 바와 같이, PCR 사이클의 증가에 따른 임피던스의 변화는 S자형 곡선을 형성하고 있으며, 이는 대수적으로 증가하는 PCR 산물의 농도를 잘 반영하고 있는 것이다. 이상과 같은 결과를 토대로, 45Ω의 간섭에 의한 오차를 수정한 결과를 도14에 나타내었다.

【발명의 효과】

- <55> 본 발명의 방법에 따르면, PCR 과정 중 리얼타임으로 PCR 산물을 측정할 수 있다.
- <56> 또한, 본 발명의 방법에 따르면, 전기적 신호를 검출함으로써 검출시스템을 소형화할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

- (a) PCR 반응 용기 내에 한 쌍 이상의 전극을 제공하는 단계;
- (b) PCR 을 수행하는 단계;
- (c) 상기 전극 사이에 전기장을 발생시키는 단계; 및
- (d) 상기 PCR 반응 용액의 유전적 특성의 변화를 측정하는 단계를 포함하는 PCR 증폭 산물을 검출하는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 PCR은 이온적으로 표지된 프라이머를 사용하지 않고 수행하는 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 PCR 반응 용기는 PCR 튜브 또는 미세 중합 반응 챔버인 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 유전적 특성은 인피던스, 유전 손실, 유전 상수 또는 어드미턴스인 방법.

【청구항 5】

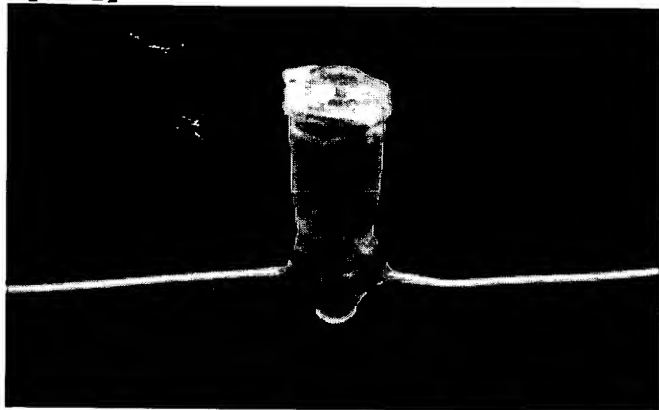
제1항에 있어서, 상기 전기장을 발생시키는 단계는 주파수 1Hz 내지 100 MHz의 교류를 사용하는 방법.

【청구항 6】

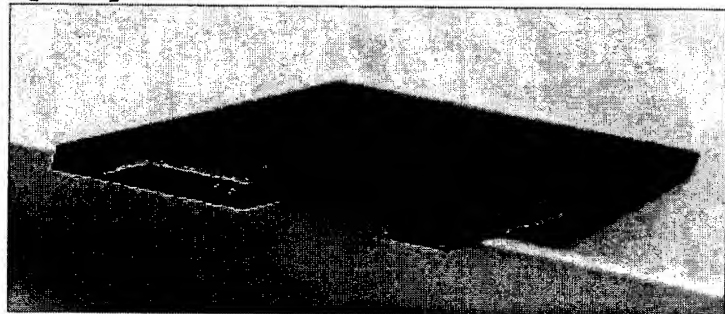
제1항에 있어서, 상기 전기장을 발생시키는 단계는 평균 전압(V_{rms}) 1 mV 내지 10 V의 교류 전압을 사용하는 방법.

【도면】

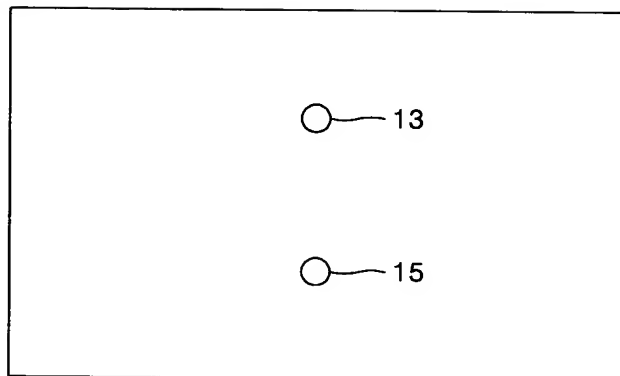
【도 1】



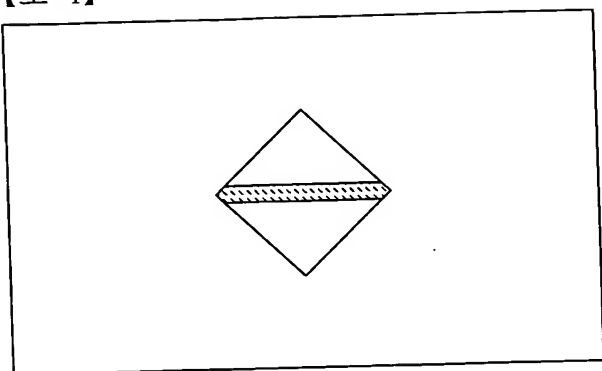
【도 2】



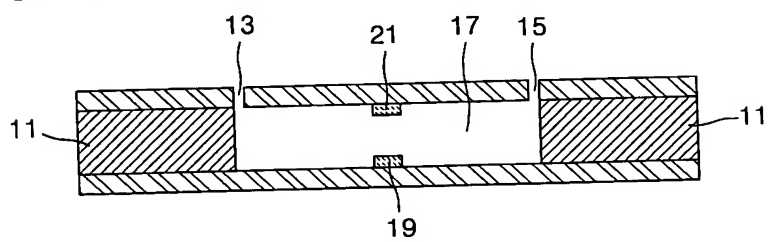
【도 3】



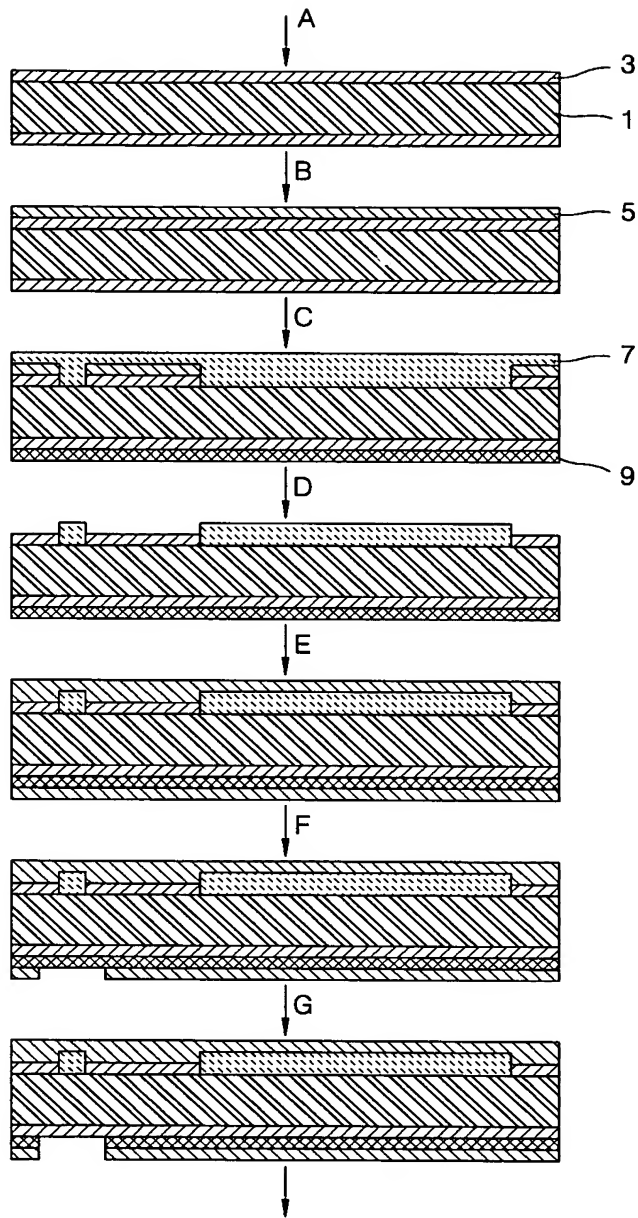
【도 4】



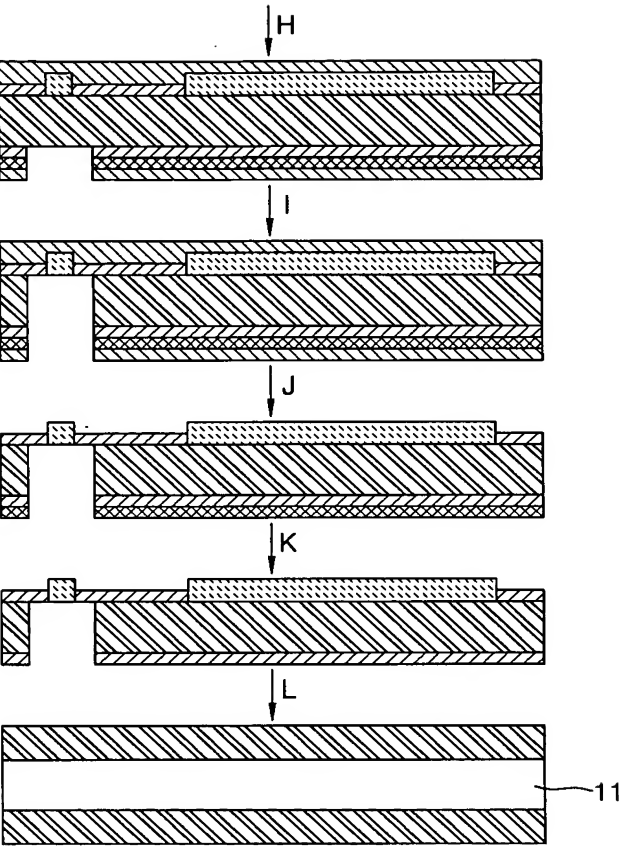
【도 5】



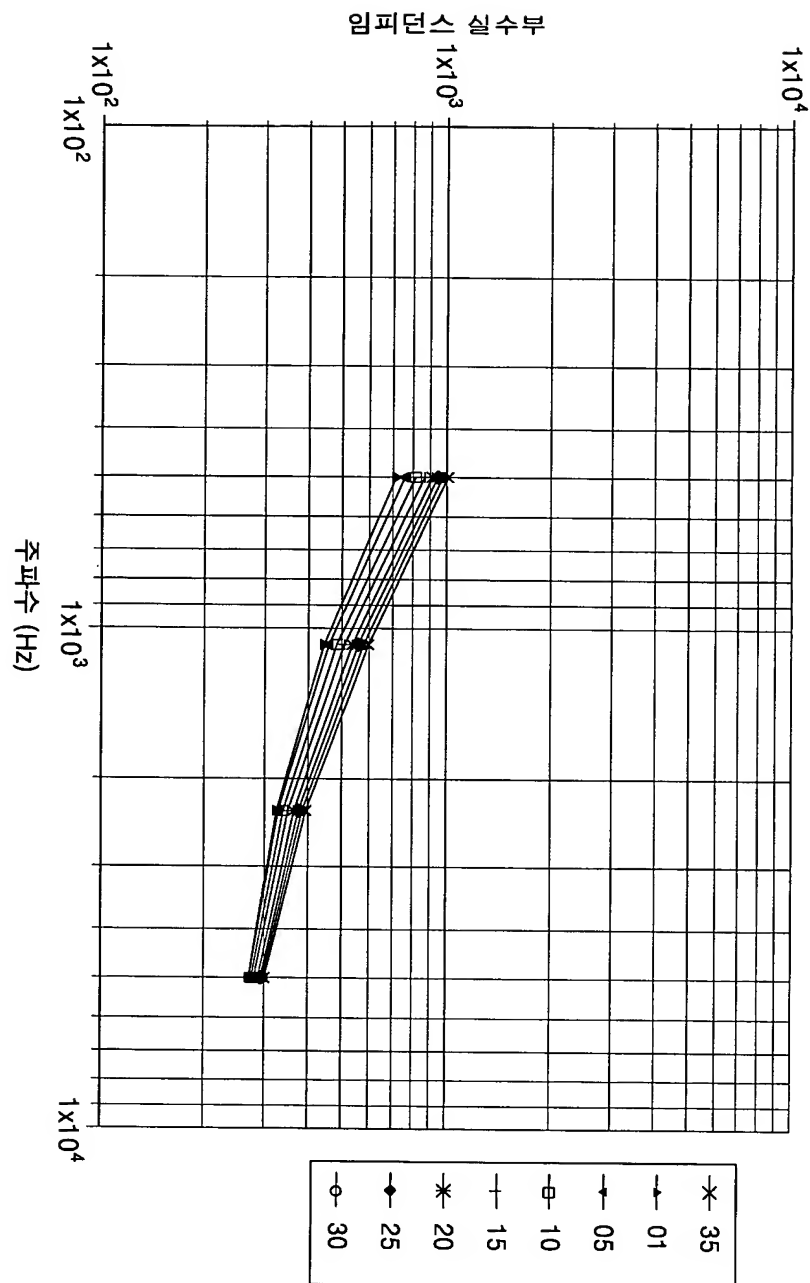
【도 6】



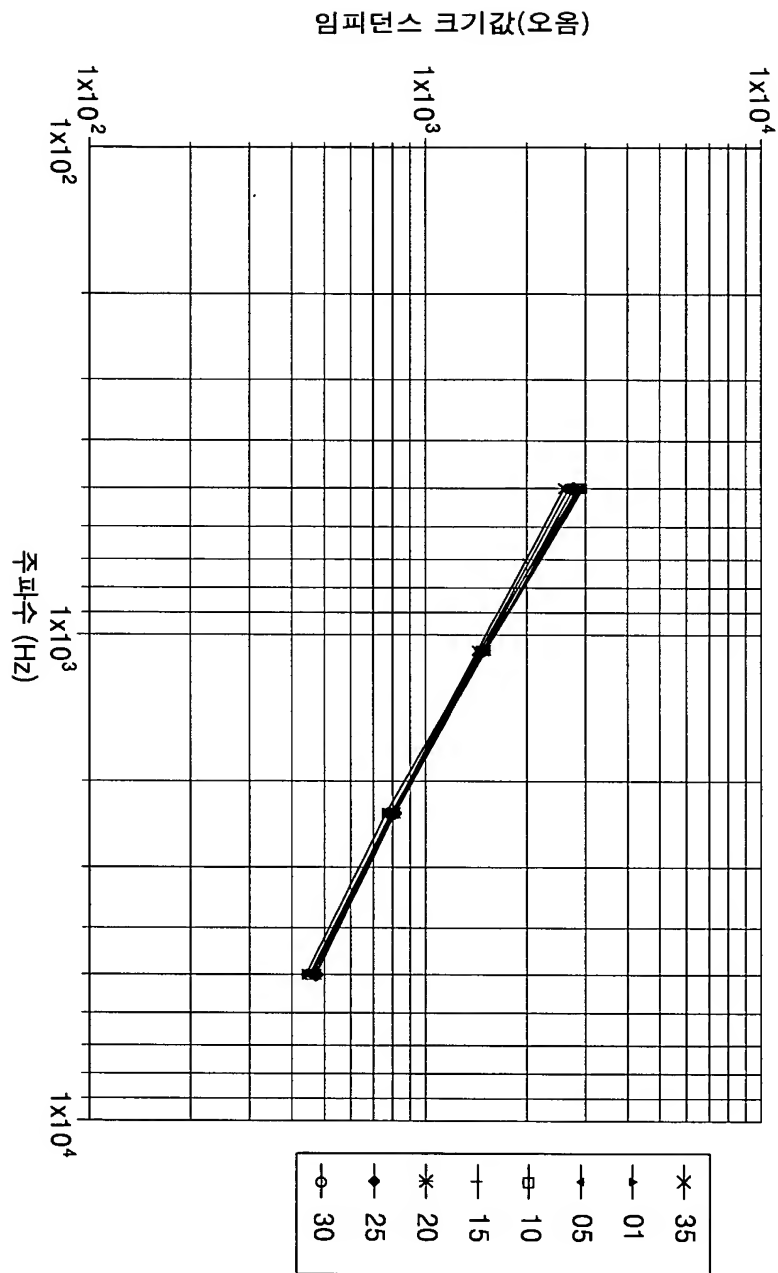
【도 7】



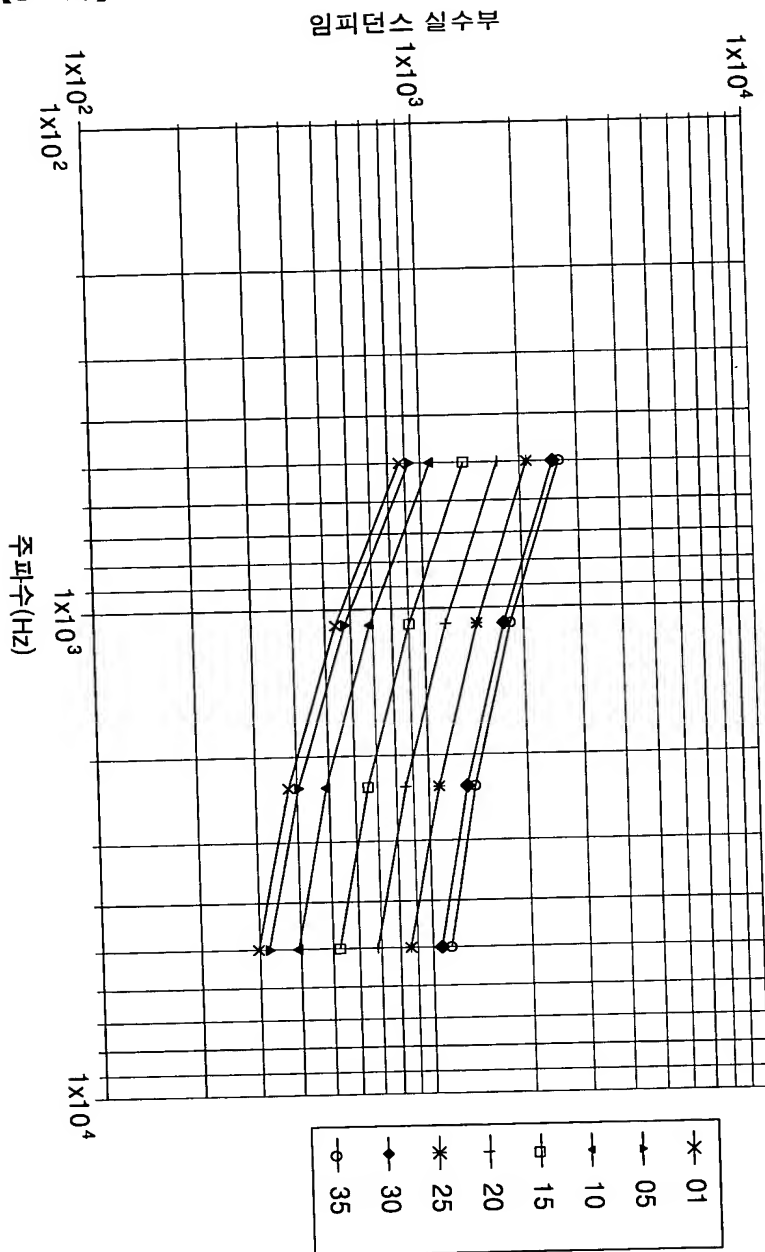
【도 8】



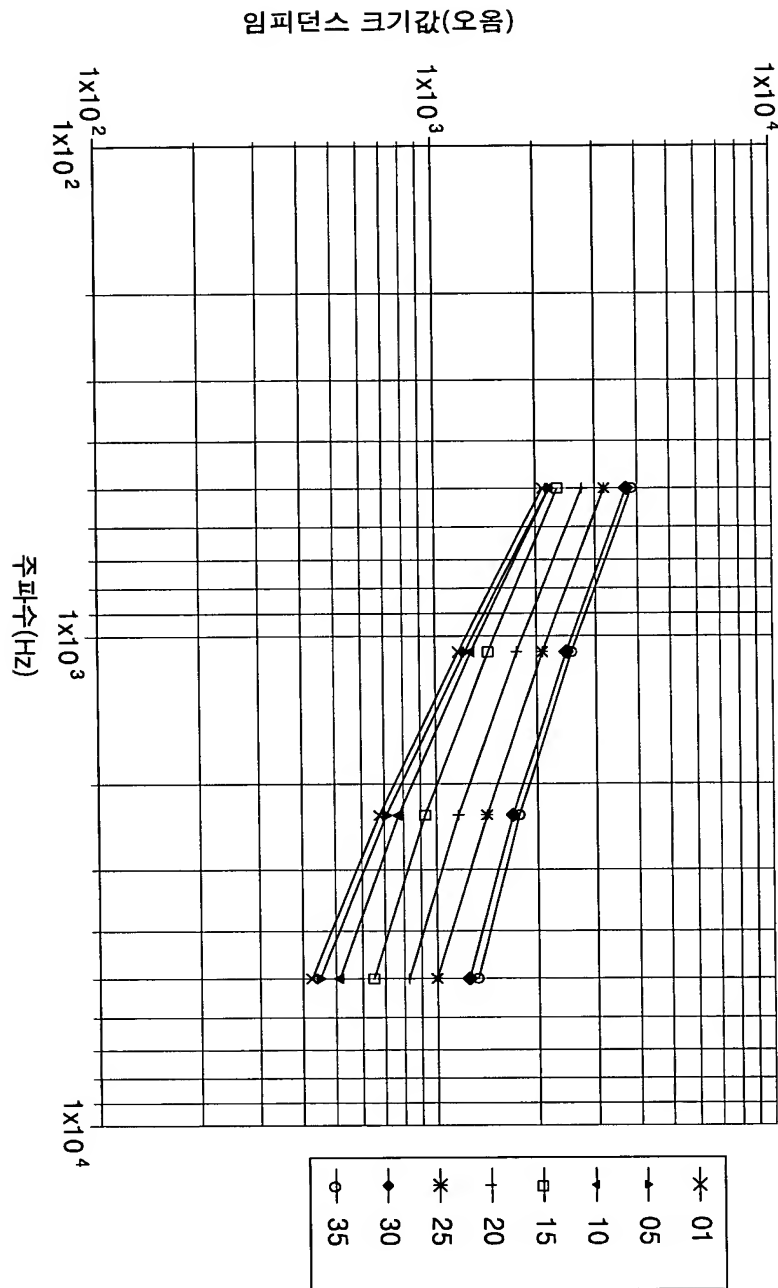
【도 9】



【도 10】

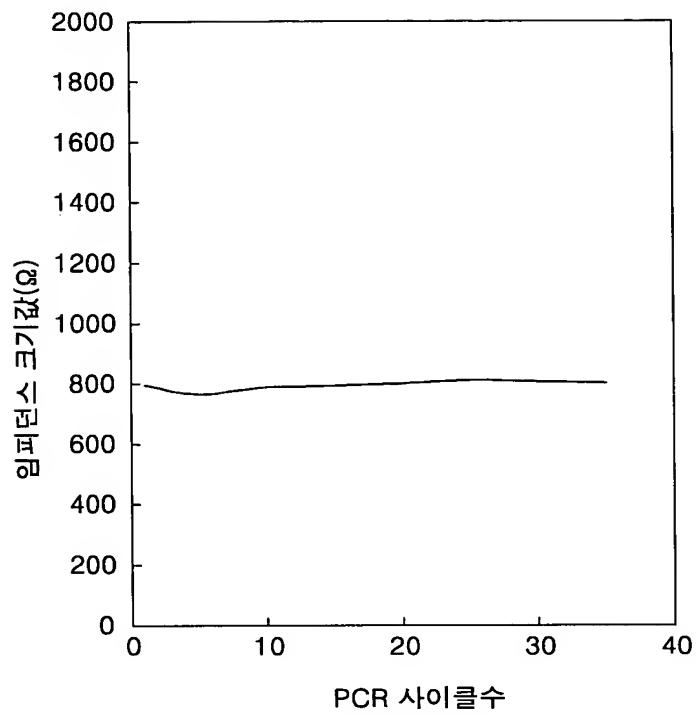


【도 11】

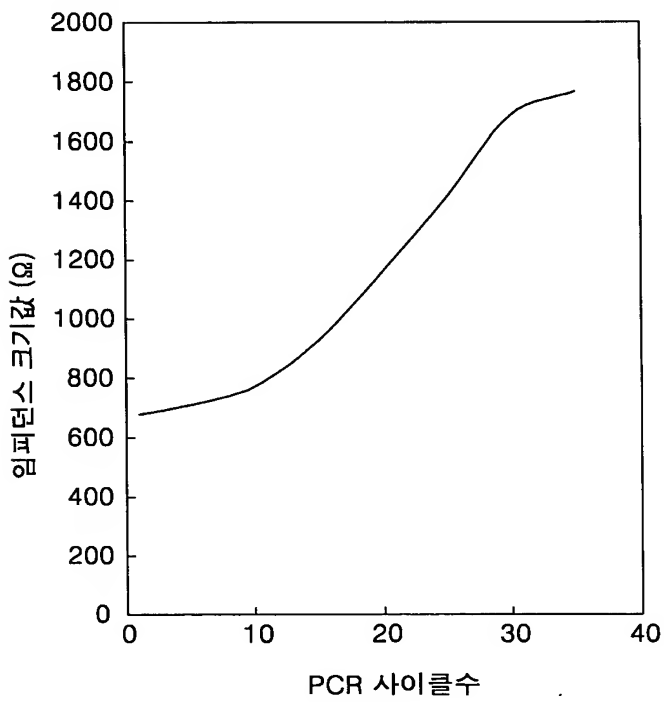




【도 12】



【도 13】



【도 14】

